

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/003460

International filing date: 01 April 2005 (01.04.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 10 2004 016 355.3
Filing date: 02 April 2004 (02.04.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 06 July 2005 (06.07.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

10 2004 016 355.3

Anmeldetag:

02. April 2004

Anmelder/Inhaber:

Rösner Research GmbH & Co KG, 76139 Karlsruhe/
he/DE

Erstanmelder: Dr. Hannsjörg Sinn, 69168 Wies-
loch/DE

Bezeichnung:

Herstellung und Verwendung des Kunjugats Me-
thotrexat-Albumin als Mittel zur Immunosuppression
bei GVHD

IPC:

A 61 K, A 61 P

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 27. April 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Kahle

WEICKMANN & WEICKMANN

Patentanwälte
European Patent Attorneys · European Trademark and Design Attorneys

Unser Zeichen:

32048P DE/MDwr

Anmelder:

Dr. Hannsjörg Sinn
Lederschen Str. 52

69168 Wiesloch

DIPL.-ING. **H. WEICKMANN** (bis 2001)
DIPL.-ING. **F. A. WEICKMANN**
DIPL.-CHEM. **B. HUBER**
DR.-ING. **H. LISKÄ**
DIPL.-PHYS. DR. **J. PRECHTEL**
DIPL.-CHEM. DR. **B. BÖHM**
DIPL.-CHEM. DR. **W. WEISS**
DIPL.-PHYS. DR. **J. TIESMEYER**
DIPL.-PHYS. DR. **M. HERZOG**
DIPL.-PHYS. **B. RUTTENSBERGER**
DIPL.-PHYS. DR.-ING. **V. JORDAN**
DIPL.-CHEM. DR. **M. DEY**
DIPL.-FORSTW. DR. **J. LACHNIT**
LL.M. DR. **U. W. HERBERTH** *

* Rechtsanwalt

**Herstellung und Verwendung des Konjugats Methotrexat-Albumin als
Mittel zur Immunosuppression bei GVHD**

Herstellung und Verwendung des Konjugats Methotrexat-Albumin als Mittel zur Immunsuppression bei GVHD

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Wirkstoff-Protein-Konjugaten zur Modulierung und insbesondere zur Vermeidung von Transplantation-assoziierten Immunreaktionen. Weiterhin wird ein neues, vorteilhaftes Herstellungsverfahren für die erfindungsgemäß einsetzbaren Konjugate bereitgestellt.

Wirkstoff-Protein-Konjugate werden verwendet, um durch Kopplung von körperfremden Wirkstoffen an ein körpereigenes Protein längere Halbwertszeiten bei Verabreichung von therapeutischen oder/und diagnostischen Wirkstoffen zu erhalten (vgl. DE 41 22 210 A1 oder WO96/32133). Bei der Behandlung von Tumorerkrankungen wird die Aufnahme von Proteinen durch proliferierende Tumorzellen ausgenutzt, um den an Proteine gebundenen Wirkstoff in solchen Zellen anzureichern, während gesundes Gewebe keine Veranlassung zur Proteinaufnahme hat. Dadurch kann eine Anreicherung der Wirkstoffe in Tumorzellen erhalten werden.

Allogene Knochenmarktransplantationen (KMT) werden in zunehmenden Maß bei der hochdosierten Strahlentherapie, Therapie haematologisch-onkologischer Erkrankungen, beispielsweise von Leukämien, Lymphomen, aplastischer Anämie oder Nierenzellkarzinomen eingesetzt. Sie sind jedoch nach wie vor, insbesondere bedingt durch immunologische Komplikationen, beispielsweise in Form der Graft-Versus-Host-Krankheit (GVHD) mit einer erheblichen direkten und indirekten Morbidität und Mortalität assoziiert, was ihre breitere Anwendbarkeit einschränkt.

Die bis zum jetzigen Zeitpunkt eingesetzten immunmodulierenden Medikamente konnten zwar die Mortalität der akuten und chronischen GVHD zum Teil vermindern, versagen jedoch bei einem Teil der Patienten und sind teilweise auch mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Hier dominiert als

Folge einer breiten Immunsuppression die Gefahr der systemischen Infektion. Dazu kommt eine Reihe Medikamenten-spezifischer Organtoxizitäten der bisher eingesetzten Medikamente, die insbesondere unter der häufig langwierigen Anwendung über Wochen oder Monate zu Komplikationen führen.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, ein Arzneimittel bereitzustellen, mit dem die im Stand der Technik auftretenden Schwierigkeiten überwunden werden können und mit dem insbesondere die Überlebensrate bei allogenen Knochenmarktransplantationen verbessert werden kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Verwendung eines Konjugats, umfassend eine Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung und ein Protein zur Herstellung eines Arzneimittels zur Modulierung einer Transplantations-assoziierten Immunreaktion.

Es wurde nun festgestellt, dass Konjugate aus Carboxylgruppen-haltigen organischen Verbindungen und Proteinen, insbesondere Albumin oder Transferrin auch erfolgreich zur Modulierung von Transplantations-assoziierten Immunreaktionen eingesetzt werden können.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Konjugate enthalten eine Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung, bei der es sich insbesondere um einen Wirkstoff, mehr bevorzugt um einen niedermolekularen Wirkstoff mit einem Molekulargewicht ≤ 1000 Da und mehr bevorzugt ≤ 500 Da handelt. Besonders bevorzugt handelt es sich bei dem Wirkstoff um ein Cytostatikum bzw. um ein Immunsuppressivum. Besonders bevorzugt wird Methotrexat bzw. Aminopterin, am meisten bevorzugt Methotrexat eingesetzt. Der Folsäure-Antagonist Methotrexat oder 4-Amino-4-desoxy-10-methylfolsäure ($C_{20}H_{22}N_8O_5$) ist ein Cytostatikum. Dieser Wirkstoff ist ein bewährter niedermolekularer Wirkstoff bei der Prophylaxe von GVHD und hat eine dosisabhängige immunsuppressive Wirkung. In der erfindungsgemäß verabreich-

ten Konjugatform kann bei insgesamt geringer und somit nebenwirkungsfreier Verabreichung eine hohe Konzentration und insbesondere eine immunsuppressive Menge des Wirkstoffs am gewünschten Wirkort erreicht werden.

5 Das erfindungsgemäße Konjugat umfasst Proteine in nativer Form. Das Protein weist bevorzugt als Molekulargewicht von ≥ 18.000 Da, mehr bevorzugt ≥ 50.000 Da auf. Günstigerweise wird, je nach Patient, dem das Konjugat verabreicht werden soll, ein entsprechendes natives Protein, insbesondere Albumin ausgewählt, also beispielsweise für die Verabreichung an
10 Menschen ein humanes Protein und bei der Verabreichung an Tiere, beispielsweise Mäuse, entsprechend ein Maus-Protein. Geeignete Proteine sind z.B. Albumin, insbesondere humanes Serumalbumin (HSA) oder Transferrin. Besonders bevorzugt wird Albumin als Protein eingesetzt.

15 Die kovalente Bindung niedermolekularer Wirkstoffe an das Makromolekül Albumin wird beispielsweise in der DE 41 22 210 A1 oder in der WO 96/32133 beschrieben, wobei dort das Konjugat zur Behandlung von Tumorerkrankungen bzw. zur Behandlung von Entzündungs-, Infektions- und/oder Hauterkrankungen eingesetzt wird. Es wurde nun festgestellt, dass sich solche Konjugate auch hervorragend zur Prophylaxe bzw. Behandlung von
20 Transplantations-assoziierten Immunreaktionen, wie beispielsweise GVHD eignen. Die erfindungsgemäß eingesetzten Konjugate ermöglichen eine deutlich gezieltere und optimierte Wirkung, insbesondere von Cytostatika und anderen Wirkstoffen in entzündlichem Gewebe und proliferierenden Stoffwechsel-aktiven Zellen. Bei einer Transplantation sind die relevanten
25 Zellen reaktive Lymphozyten und Zellen des monozyten Phagozytensystems (MPS), hier insbesondere die dendritischen Zellen der reaktiven lymphatischen Gewebe. Es wurde zudem überraschenderweise festgestellt, dass die erfindungsgemäß eingesetzten Konjugate nicht eine generelle Immunsuppression im gesamten Organismus verursachen sondern vielmehr eine
30 selektive Modulierung und insbesondere Suppression von Transplantations-assoziierten Immunreaktionen und bevorzugt von GVHD bewirken.

Die optimierte Aufnahme wird insbesondere durch eine günstige Kinetik von Albumin, beispielsweise mit einer Plasmahalbwertszeit von ca. 19 Tagen im Menschen, und durch die Bedeutung von Albumin als potenzieller Nährstoff für proliferierende Zellen bewirkt. Während bei der Verabreichung von freien
5 Wirkstoffen der Anteil der Wirkstoffe, die in den für Transplantations-assoziierte Immunreaktionen relevanten Zellen nur kurzzeitig zur Wirkung gekommen sehr gering ist, ermöglichen die erfindungsgemäßen Konjugate eine Anreicherung des Wirkstoffs in den relevanten Zellen über einen langen Zeitraum.

10 Aufgrund der langen biologischen Halbwertszeit ist z.B. der Aktivitätsanteil im Blut des Konjugats MTX-HSA etwa 300 mal größer als der des niedermolekularen MTX alleine.

15 Im Organismus werden unbekannte Substanzen üblicherweise schnell ausgeschieden bzw. abgefangen, beispielsweise wasserlösliche Verbindungen über die Nieren ausgeschieden oder wasserunlösliche Verbindungen innerhalb weniger Minuten von der Leber abgefangen. Körpereigene Eiweiße, beispielsweise Albumin haben dagegen eine lange Verweilzeit im Organismus. Es ist in hohen Mengen in Geweben vorhanden und nicht immunogen.
20 Durch Kopplung von an sich schnell aus dem Körper entfernt werdenden Wirkstoffen an solche körpereigene Eiweiße werden die Wirkstoffe vor den Ausscheidungs- bzw. Abfangmechanismen des Körpers verborgen und können somit ebenfalls eine lange Halbwertszeit im Körper erreichen. Dadurch ist es aber möglich, nur geringe Mengen an Wirkstoff zu verabreichen und somit gegebenenfalls auftretende Nebenwirkungen praktisch vollkommen auszuschalten. Toxische Effekte auf gesundes Gewebe oder Organe erfolgt praktisch nicht, da normale Zellen keine Veranlassung zur Proteinaufnahme haben. Es wurde nun überraschenderweise festgestellt, dass die erfindungsgemäßen Konjugate nicht nur in Tumorzellen sondern auch in für
30 Transplantations-assoziierten Immunreaktionen relevanten Zellen aufgenommen werden und somit zu einer Wirkstoffanreicherung in diesen Zellen führen.

Aufgrund der langen Verweildauer der erfindungsgemäß eingesetzten Konjugate im Körper kann eine Prophylaxe oder/und Behandlung von GVHD erfolgreich durchgeführt werden, auch wenn die Intervalle zwischen den einzelnen Verabreichungen des Konjugats mehr als 5 Tage, vorzugsweise
5 mehr als 10 Tage, insbesondere mehr als 13 Tage oder sogar mehr als 20 Tage betragen. Auf diese Weise ist es möglich, Patienten ohne das Auftreten von Nebenwirkungen über Jahre hinweg z.B. alle 2 bis 3 Wochen eine entsprechende Erhaltungsdosis zu verabreichen.

10 Die erfindungsgemäßen Konjugate enthaltend einen kovalent an ein Protein, insbesondere an Albumin gebundenen Wirkstoff, bevorzugt Methotrexat, eignen sich zur Modulierung und insbesondere zur Vermeidung von Transplantation-assoziierten Immunreaktionen. Unter Modulierung wird
15 dabei hierin jede Beeinflussung bzw. Veränderung der Immunreaktionen verstanden und insbesondere eine Verstärkung oder Verringerung der Immunreaktion, insbesondere um mindestens 10 %, bevorzugt um mindestens 20 %. Besonders bevorzugt wird eine wesentliche Verringerung um z.B. mindestens 50 %, mehr bevorzugt um mindestens 70 % oder eine Vermeidung der Transplantations-assoziierten Immunreaktionen erreicht. Diese
20 Wirkung eröffnet ein breites Einsatzspektrum für die erfindungsgemäßen Konjugate zur Vermeidung immunologischer Komplikationen bei Transplantationen, insbesondere bei allogenen oder autologen Knochenmarktransplantationen aber auch zur Vermeidung von Empfänger-vermittelten Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen, insbesondere
25 bei Fremdspender-Organtransplantationen von beispielsweise Niere, Herz oder Leber.

Die erfindungsgemäßen Konjugate können deshalb vorteilhafterweise zur
30 Behandlung oder/und Prophylaxe von GVHD und insbesondere von akuter oder chronischer GVHD eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Konjugate eignen sich insbesondere zur Verabreichung an Menschen.

Die Verabreichung der erfindungsgemäßen Konjugate erfolgt in der Regel intravenös. Für eine wirksame Behandlung werden als Dosiseinheit vorzugsweise 0,1 bis 1000 mg Konjugat pro kg Körpergewicht, insbesondere 1 bis 100 mg Konjugat pro kg Körpergewicht verabreicht. Mit den erfindungsgemäßen Konjugaten kann bei geringer Dosierung von z.B. ≤ 5 mg und insbesondere ≤ 3 mg Konjugat pro kg Körpergewicht bereits eine Wirkung erzielt werden. In den Konjugaten beträgt das Molverhältnis von Wirkstoff zu Trägerprotein vorzugsweise 1:1000 bis 2:1, insbesondere 1:100 bis 1:1, besonders bevorzugt 0,9 bis 1,1:1. So zeigt z.B. Albumin bei einer 1:1 Beladung mit Methotrexat immer noch natives Verhalten. Eine Dosiseinheit an Wirkstoff beträgt vorzugsweise 0,1 bis 100 mg pro kg Körpergewicht, insbesondere 1 bis 10 mg pro kg Körpergewicht, wobei oftmals geringe Dosiseinheiten von ≤ 5 mg, insbesondere ≤ 2 oder ≤ 1 mg pro kg Körpergewicht besonders bevorzugt sind. Aufgrund der langen Verweilzeit der Konjugate im Menschen ist dabei eine Gabe von höchstens einer Dosiseinheit pro Tag, bevorzugt pro Woche, mehr bevorzugt pro 2 Wochen ausreichend. Für Tiere, z.B. Mäuse, wird bevorzugt eine Dosiseinheit pro Tag verabreicht.

Für die Herstellung der erfindungsgemäß eingesetzten Konjugate ist eine effiziente kovalente Kopplung des Wirkstoffes an das Trägermolekül (also das Protein) von Bedeutung. Bei der Kopplung darf es insbesondere nicht zu einer unerwünschten Veränderung des Trägerproteins oder/und des Wirkstoffes kommen. Die bisher übliche Aktivierung Carboxylgruppen-haltiger organischer Verbindungen mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) erfordert bei Raumtemperatur oder bei $+4$ °C mehr als 12 Stunden (DP 41 22 210 A1; EP 0 820 308). Bei diesem Verfahren bilden sich zudem bei der Aktivierung unlösliche Substanzen, die zum Teil bereits während der Aktivierung und zum Teil beim Eintragen des aktivierten Wirkstoffs in eine wässrige Proteinlösung ausfallen und, damit das Konjugat medizinisch verabreicht werden kann,

durch zeitaufwändige und teure Filtrationsschritte zusätzlich zu der eigentlichen Produktreinigung abgetrennt werden müssen und nie 100 %-ig sind (wegen der lipophilen Domänen im Albumin).

5 Es bestand deshalb der Bedarf ein Verfahren zur Herstellung von Wirkstoff-Protein-Konjugaten bereitzustellen, bei dem diese Probleme nicht auftreten und bei dem insbesondere keine wasserunlöslichen Nebenprodukte gebildet werden.

10 Diese Aufgabe wurde erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung eines Konjugats enthaltend

i) eine Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung, insbesondere Methotrexat und

ii) ein Protein, insbesondere Albumin,

15 welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung und ein Protein in Gegenwart von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und von N-Hydroxysuccinimid umsetzt.

20 Überraschenderweise wurde festgestellt, dass durch die Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC), insbesondere in Form des Hydrochlorids, eine Aktivierung der Carboxylgruppen-haltigen organischen Verbindung und eine Umsetzung mit einem Trägerprotein erreicht werden kann, ohne dass wasserunlösliche Nebenprodukte gebildet werden, die zeit- und kostenaufwändig abzutrennen wären. Durch dieses
25 Verfahren werden Zwischenreinigungsschritte überflüssig und die Präparationszeit und damit auch die Herstellungskosten werden wesentlich reduziert. Weiterhin werden Probleme, die bei der Injektion des Konjugats in einen menschlichen oder tierischen Körper durch unlösliche Substanzen oder Nebenprodukte hervorgerufen werden, vermieden.

30 Die Aktivierung erfolgt bevorzugt bei einer Temperatur von 10 bis 100 °C, mehr bevorzugt 20 bis 70 °C und noch mehr bevorzugt 40 bis 65 °C für eine Reaktionszeit von 1 Minute bis 10 Stunden, mehr bevorzugt von 10 bis 30

Minuten. Die Umsetzung des aktivierten Wirkstoffes mit dem Trägerprotein erfolgt vorzugsweise bei einer Temperatur zwischen 10 und 50 °C, insbesondere zwischen 20 und 40 °C.

5 Bevorzugt wird die Aktivierung der Carboxyl-haltigen Verbindung, insbesondere von Methotrexat mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und N-Hydroxysuccinimid in einem organischen Lösungsmittel, bevorzugt in Dimethylacetamid durchgeführt. Weitere geeignete organische Lösungsmittel sind z.B. DMSO (Dimethylsulfoxid), Dioxan oder Cyclohexan. Die Aktivierung wird vorzugsweise unter Ausschluss von Wasser durchgeführt, insbesondere in Gegenwart von ≤ 5 Gew.-% Wasser, mehr bevorzugt ≤ 1 Gew.-% Wasser und am meisten bevorzugt vollständig wasserfrei. Durch Aktivierung der Carboxylgruppen-haltigen Verbindung mit eingesetzten Substanzen EDC und N-Hydroxysuccinimid in einem organischen, 10 wasserfreien Lösungsmittel reagieren diese nicht mit Protein, z.B. Albumin und verändern auch nicht dessen Struktur.

Ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens besteht darin, dass die eingesetzten Aktivierungsreagenzien, also 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid sowie N-Hydroxysuccinimid eine hohe 20 Wasserlöslichkeit aufweisen. Dadurch können bei der Umsetzung nicht verbrauchte Kopplungsreagenzien auf einfache Weise aus dem gewonnenen Produkt, beispielsweise durch Waschen mit Wasser entfernt werden. Im Gegensatz dazu verbleibt bei den im Stand der Technik verwendeten Kopplungsreagenzien, beispielsweise bei der Verwendung von Di-cyclohexyl-carbodiimid (DCC) ein nicht auftrennbarer Rest an Kopplungsreagenz im Konjugat. 25 So ist bei einem Methotrexat-Albumin-Konjugats und Verwendung von DCC ein nicht abtrennbarer Rest von etwa 13 bis 15 Gew.-% an DCC im Konjugat zu beobachten, der wahrscheinlich an eine lipophile Domäne im Albumin gebunden ist. Dieser Rest kann nur mit Hilfe von HPLC nachgewiesen und nur 30 unter erheblichem Aufwand präparativ abgetrennt werden.

Erfindungsgemäß werden bei der Umsetzung die Carboxylgruppen-haltige

organische Verbindung, insbesondere Methotrexat und das Protein, ins

besondere Albumin, in einem Molverhältnis von 10:1 bis 1:10, insbesondere 1,5:1 bis 1:1,5 eingesetzt.

5

10

15

20

Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Konjugate können aufgrund ihrer hohen Reinheit für zahlreiche Verwendungen und insbesondere für eine intravenöse Verabreichung vorgesehen werden. Somit können solche Konjugate, beispielsweise bei Verwendung einer Carboxylgruppenhaltigen organischen Verbindung mit immunsuppressiver Wirkung vorteilhafterweise zur Herstellung von Arzneimitteln zur Modulierung einer Transplantations-assoziierten Immunreaktion, insbesondere zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe oder/und Behandlung von GVHD eingesetzt werden. Es ist aber auch möglich unter Verwendung von Carboxylgruppenhaltigen organischen Verbindungen mit cytostatischer Wirkung ein Arzneimittel zur Behandlung oder/und Prophylaxe oder/und Diagnose von Tumorerkrankungen herzustellen. Erfindungsgemäß hergestellte Konjugate eignen sich auch zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung oder/und Diagnose von Entzündungs-, Infektions- und/oder Hauterkrankungen.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert.

Beispiel 1

25

Herstellungsbeispiel:

Methotrexat (MTX) wird mittels 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (HSI) aktiviert und anschließend mit Albumin (A) zu MTX-A umgesetzt.

30

Methotrexat-Aktivierung:

20 mg Methotrexat (MTX; FG: 454, 45; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) werden zusammen mit 25 mg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (EDC, FW: 191,7, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) und 60 mg N-Hydro-

xysuccinimid (HSI, FW: 115,1; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in 2 ml Dimethylacetamid (DMAA) gelöst. Die Reaktionsmischung wird in ein auf 60 °C vorgeheiztes Wasserbad gebracht. Nach einer Reaktionszeit von etwa 30 min wird die Aktivierungslösung, nach Abkühlung auf Raumtemperatur, langsam in eine 5 %-ige HSA-Lösung (10 ml 20 %-ige HSA-Originallösung werden mit 30 ml H₂O dest. verdünnt) eingetragen.

Die Abtrennung der für die Kopplung von MTX erforderlichen Begleitstoffe (DMAA, HSI, Dimethylharnstoff und nicht gebundenes Methotrexat) erfolgt über Ultrafiltration (Dialyse) mit einer Ausschlussgrenze von 30 KD (YM 30).

Reinheitskontrolle (HPLC):

Vorsäule:	25 x 10 mm LiChrospher DJOL, 5 µm
Säule:	250 x 10 mm LiChrospher DJOL, 5 µm
Laufmittel:	Na-Citrat, 0,2 M, pH 7,4
Fluss:	1,0 ml/min
Druck:	etwa 95 bar
UV-Monitor	280 nm

Retentionszeiten:

dimere SA-Fraktion	5,8 min
monomere SA-Fraktion	7,0 min
niedermolekulares MTX	33,8 min

Beispiel 2

Tierversuche: (Genehmigungs Nr. LVL M-V310-4/7221.3-1.2-015/03 Landesveterinäramt Mecklenburg-Vorpommern Rostock)

Mit dem lang zirkulierenden, makromolekularen MTX-HSA wurden erste statistisch signifikante Versuche mit GVHD-Tieren an der Universitätsklinik Rostock in der Abteilung von Prof. Dr. M. Freund unter der Leitung von PD.Dr.G. Hartung und Dr. D. Wolff durchgeführt. Dabei wurden 20 weibliche F1 hybrid BN/Lew-Ratten nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 7,5 Gy (n =

10) oder 9 Gy ($n = 10$) mit 40 Millionen Knochenmarkszellen und 15 Millionen T-Lymphozyten von weiblichen Lew-Ratten transplantiert. 10 Ratten erhielten am Tag 0, 4, 8 und 12,2 mg/kg Methotrexat-Albumin intraperitoneal, während 10 weitere Ratten lediglich die äquivalente Menge Albumin zu den identischen Zeitpunkten intraperitoneal erhielten. Im Ergebnis konnte nachgewiesen werden, dass lediglich eine Ratte aus der Gruppe, welche Methotrexat-Albumin erhielt, eine akute GVHD entwickelte, während in der Kontrollgruppe alle Tiere an den Folgen einer akuten GVHD verstarben. Signifikante Nebenwirkungen von Methotrexat-Albumin waren nicht nachweisbar, während beiden mit äquieffektiven MTX-Dosen behandelten Tieren deutliche Nebenwirkung zu beobachten waren.

Ansprüche

- 5 1. Verwendung eines Konjugats, umfassend eine Carboxylgruppenhaltige organische Verbindung und ein Protein zur Herstellung eines Arzneimittels zur Modulierung einer Transplantations-assoziierten Immunreaktion.
- 10 2. Verwendung nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Vermeidung einer Transplantations-assoziierten Immunreaktion.
- 15 3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe oder/und Behandlung von GVHD (Graft Versus Host Disease).
- 20 4. Verwendung nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass es sich um eine akute GVHD handelt.
- 25 5. Verwendung nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass es sich um eine chronische GVHD handelt.
- 30 6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass es sich bei der Transplantation um eine Knochenmarktransplantation handelt.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass es sich bei der Transplantation um eine Organtransplantation, insbesondere um eine Nieren-, Herz- oder Lebertransplantation handelt.

8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass es sich um eine allogene Transplantation handelt.

5

9. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung ausgewählt
ist aus Cytostatika oder Immunsuppressiva.

10

10. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass es sich bei der Carboxylgruppen-haltigen organischen Ver-
bindung um Methotrexat oder Aminopterin handelt.

15

11. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass es sich bei dem Polypeptid um ein natives humanes Polypeptid
handelt.

20

12. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass es sich bei dem Polypeptid um Albumin, insbesondere um
humanes Albumin handelt.

25

13. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass es sich bei dem Konjugat um ein Methotrexat-Albumin-Konjugat
handelt.

30

14. Verfahren zur Herstellung eines Konjugats enthaltend
i) eine Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung und
ii) ein Protein,

dadurch gekennzeichnet,

dass man eine Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung und ein Protein in Gegenwart von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und von N-Hydroxysuccinimid umsetzt.

5

15. Verfahren nach Anspruch 14,

dadurch gekennzeichnet,

dass es sich bei der Carboxylgruppen-haltigen organischen Verbindung um ein Cytostatikum oder ein Immunosuppressivum handelt.

10

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15,

dadurch gekennzeichnet,

dass es sich bei der Carboxylgruppen-haltigen organischen Verbindung um Methotrexat handelt.

15

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16,

dadurch gekennzeichnet,

dass das Protein Albumin ist.

20

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17,

dadurch gekennzeichnet,

dass man die Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung in einem organischen Lösungsmittel, insbesondere in einem wasserfreien organischen Lösungsmittel mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und N-Hydroxysuccinimid aktiviert und anschließend die aktivierte Carboxylgruppen-haltige organische Verbindung mit dem Protein umsetzt.

25

30

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Wirkstoff-Protein-
5 Konjugaten zur Modulierung und insbesondere zur Vermeidung von
Transplantation-assoziierten Immunreaktionen. Weiterhin betrifft die Er-
findung ein neues, vorteilhaftes Herstellungsverfahren für die erfindungsge-
mäß einsetzbaren Konjugate.

10

wr/ANM/32048PDE-anm/ 02.04.2004